

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZABELA MOURA DUIN

ETIOLOGIA DA PODRIDÃO DE MINISTACAS DE ACÁCIA-NEGRA  
EM TRIUNFO-RS

Curitiba

2017

IZABELA MOURA DUIN

ETIOLOGIA DA PODRIDÃO DE MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA  
EM TRIUNFO-RS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Co-orientadores:

Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa

Curitiba

2017

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Duin, Izabela Moura

Etiologia da podridão de miniestacas de acácia-negra em Triunfo-RS /  
Izabela Moura Duin. – Curitiba, 2017.  
50 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientadores: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba,  
24/02/2017.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Acácia - Doenças e pragas. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Viveiros florestais -  
Triunfo (RS). 4. Pragas florestais - Etiologia. 5. Teses. I. Auer, Celso Garcia. II. Santos,  
Álvaro Figueredo dos. III. Higa, Antonio Rioyei. IV. Universidade Federal do Paraná,  
Setor de Ciências Agrárias. V. Título.

CDD – 634.96  
CDU – 634.0.44



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA FLORESTAL

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **IZABELA MOURA DUIN** intitulada: **ETIOLOGIA DA PODRIDÃO DE MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA EM TRIUNFO-RS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

Curitiba, 24 de Fevereiro de 2017.



CELSO GARCIA AUER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



IDA CHAPAVAL PIMENTEL

Avaliador Externo (UFPR)



SANDRA REGINA CABEL

Avaliador Externo (PUC/PR)



Dedico esse trabalho a DEUS pela saúde,  
oportunidade que me concedeu e força de vontade...

Ao meu pai, Gilson (*in memoriam*), que concedeu ensinamentos valiosos,  
a minha mãe, Ester, que estava presente em todos os momentos,  
ao meu irmão, Leonardo, pela amizade e estímulo,  
à minha tia e mãe postiça, Elza, pelo carinho e incentivo,  
à todos esses, por todo o amor envolvido.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelas minhas conquistas até o momento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, pela possibilidade de cursar o mestrado.

Ao pesquisador Dr. Celso Garcia Auer, da Embrapa Florestas, pelos anos de orientação, estímulo, confiança e amizade.

Ao pesquisador Dr. Álvaro Figueredo dos Santos e ao Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa, pela co-orientação e sugestões para a conclusão deste.

Aos colegas e companheiros de laboratório, Thiare, Eduardo, Izabele, Maria Cecília, Etienne e Ana Lídia, pela amizade e ajuda nestes dois anos de trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Davi Nunes da Viegas e Caroline de Bastos Bühner, pela ajuda na condução dos experimentos e amizade.

À empresa TANAC S.A., pelo apoio logístico e financeiro para a coleta do material, em especial às pessoas que estiveram diretamente ligadas ao meu trabalho, Augusto Simon, Marcos Behling e Eduardo Kneipp Londero e aos funcionários do viveiro, pela ajuda no fornecimento de material vegetal.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Maria Alves Ferreira (UFLA), Prof<sup>a</sup>. Dr. Ida Chapaval Pimentel, M. Sc. Carolina Gracia Poitevin (UFPR) e M. Sc. Thaissa de Paula Faria dos Santos (UFLA), pelo auxílio com a identificação dos fungos.

Aos professores, pelos ensinamentos e colaboração.

À Embrapa Florestas, pelo suporte para desenvolvimento do meu projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de mestrado.

Aos familiares, pelo apoio e paciência nesta fase da minha vida.

Aos meus amigos e à todas aquelas pessoas que, mesmo não mencionadas, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*Tudo posso naquele que me fortalece, Cristo.*

*Filipenses: 4:13*

## RESUMO

Acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) é uma leguminosa arbórea, originária da Austrália, que vem sendo cultivada em vários países. No Brasil, é plantada no estado do Rio Grande do Sul, com a finalidade de produção de tanino, extraído da casca, e de celulose e energia, provenientes da madeira. A acácia-negra é de grande importância econômica e social nas pequenas propriedades existentes na região de plantio. Os plantios comerciais de acácia-negra são estabelecidos por mudas seminais, mas também plantios clonais também estão sendo implantados. Um dos fatores limitantes à produção de mudas clonais é a ocorrência de podridão de miniestacas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a podridão de miniestacas de *A. mearnsii* em três clones comerciais, testar a patogenicidade dos principais fungos encontrados e buscar as fontes de inóculo dos fungos causadores de podridão em miniestacas. As coletas de material foram efetuadas em viveiro na região de Triunfo/RS, em setembro/2015 (1ª coleta) e março/2016 (2ª coleta). Coletou-se miniestacas em fase de enraizamento com podridão e sadias; brotações aparentemente sadias; brotações com lesões escuras; amostras do substrato utilizado para o enraizamento das miniestacas; água utilizada para a irrigação; provável material doente nas minicepas dos jardins clonais; areia proveniente dos canaletões dos minijardins; tubetes; e britas provenientes do piso da estufa. Para detecção de fungos, utilizou-se os métodos de isolamento direto, isolamento indireto, isolamento de fungos endofíticos, diluição em série, teste com isca e plaqueamento de resíduos. *Calonectria polizzii* e *Neopestalotiopsis clavispora* são os agentes causais da podridão de miniestacas de acácia-negra. Brotações e miniestacas assintomáticas, substrato usado, piso da estufa e tubetes podem ser fontes de inóculo.

**Palavras chave:** *Acacia mearnsii*, *Calonectria polizzii*, doença em viveiro, propagação vegetativa.



## ABSTRACT

Black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild) is a leguminous tree native to Australia, which has been grown in several countries. In Brazil, it has been planted, in Rio Grande do Sul, mainly for the purpose of producing tannin extracted from bark, cellulose and energy from wood. Black wattle has great economic and social importance in the small properties existing in the region of planting. Black wattle commercial plantings are established by seminal seedlings and clonal plantations are also being implanted, but one of the limiting factors to the production of clonal seedlings is the occurrence of rot minicuttings. In this way, the present study aimed to evaluate the rot of *A. mearnsii* minicuttings in three commercial clones, to test the pathogenicity of the main fungi found and to search inoculum sources of fungi that cause rot minicuttings. The material were collected in a nursery in the region of Triunfo/RS, in September/2015 (1<sup>st</sup> collection) and March/2016 (2<sup>nd</sup> collection). Healthy and rotten minicuttings in rooting phase, apparently healthy clonal minigarden sprouts; sprouts with dark lesions; substrate used for the minicuttings rooting; water used for irrigation; diseased ministumps; sand from clonal minigarden; plastic tubes; and cracked stones from the greenhouse floor were collected. For detection of fungi, methods of direct isolation, indirect isolation and isolation of endophytic fungi, serial dilution, bait test and plating of residues were used. *Calonectria polizzii* and *Neopestalotiopsis clavispora* are the causal agents of black wattle rot minicuttings. Sprouts and asymptomatic minicuttings, greenhouse floor, plastic tubes and infested containers are source of inoculum.

**Key words:** *Acacia mearnsii*, *Calonectria polizzii*, nursery disease, vegetative propagation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- EVOLUÇÃO DA ACACICULTURA NO RIO GRANDE DO SUL NO PERÍODO DE 1930 A 2000.....	16
FIGURA 2	- FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE MUDA CLONAL NO VIVEIRO.....	21
FIGURA 3	- DETALHE DA MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	22
FIGURA 4	- TESTE COM ISCAS PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE <i>Cylindrocladium</i> sp. EM SUBSTRATO.....	28
FIGURA 5	- ISOLAMENTO DIRETO DE MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA MORTAS E COM PODRIDÃO.....	32
FIGURA 6	- PATOGENICIDADE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA.....	36
FIGURA 7	- CONIDIÓFOROS DE <i>Cylindrocladium</i> sp. OBSERVADOS EM TESTE COM ISCA EM SUBSTRATO USADO.....	40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- FUNGOS ISOLADOS DE MINISTACAS DE TRÊS CLONES DE ACÁCIA-NEGRA (PRIMEIRA COLETA – SETEMBRO/2015; SEGUNDA COLETA – MARÇO/2016), TRIUNFO/RS.....	31
TABELA 2	- FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE MINISTACAS SADIAS DE ACÁCIA-NEGRA SETEMBRO/2015, TRIUNFO/RS.....	34
TABELA 3	- COMPRIMENTO MÉDIO (MM) DO APODRECIMENTO E RECUPERAÇÃO (%) DAS MINISTACAS APÓS SETE DIAS DA INOCULAÇÃO DE <i>Calonectria polizzii</i> e <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> .....	37
TABELA 4	- COMPRIMENTO DE LESÃO (MM) E REISOLAMENTO (%) DE ISOLADOS DE <i>Calonectria polizzii</i> APÓS CINCO DIAS DE INOCULAÇÃO EM MINISTACAS DE ACÁCIA-NEGRA.....	38
TABELA 5	- POSSÍVEIS FONTES DE INÓCULO DE FUNGOS EM VIVEIRO COM PODRIDÃO DE MINISTACAS DE ACÁCIA-NEGRA. MARÇO/2016, TRIUNFO/RS.....	39

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos .....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1. A acácia-negra.....	12
3.2. A cultura da acácia-negra no Brasil .....	14
3.3. Doenças em viveiros florestais .....	16
3.4. Principais doenças em acácia-negra .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1. Caracterização da área de estudo .....	20
4.2. Amostragem da podridão de miniestacas de acácia-negra .....	22
4.3. Análises laboratoriais.....	23
4.4. Identificação dos fungos isolados .....	24
4.5. Aplicação dos Postulados de Koch e teste de agressividade .....	25
4.6. Identificação de fontes de inóculo.....	26
4.7. Tratamento estatístico dos dados .....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
5.1. Fungos presentes em miniestacas de acácia-negra com podridão .....	30
5.2. Fungos endofíticos em miniestacas de acácia-negra .....	34
5.3. Patogenicidade de fungos em miniestacas de acácia-negra .....	35
5.4. Fontes de inóculo.....	38
6. CONCLUSÕES.....	41
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

Acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild., *Fabaceae*) é considerada excelente espécie para florestamento, pelo rápido crescimento e aproveitamento integral da madeira (MARCHIORI, 1997; SANTOS *et al.*, 2001a), destinada à produção de celulose e papel, aglomerados e energia, e a casca para extração de tanino (CALDEIRA *et al.*, 2004). Plantada principalmente por pequenos produtores do estado do Rio Grande do Sul, visa suprir as empresas de base florestal (DEDECEK e HIGA, 2003), com uma área aproximada de 189.000 ha em 2007 (ABRAF, 2008). Em 2017, faltam dados concretos da área plantada, por serem somadas com *Acacia mangium*.

Grande parte do cultivo de acácia-negra ainda é estabelecido a partir de mudas produzidas por sementes, resultando em florestas com alta variabilidade genética e, conseqüentemente, variabilidade na produtividade florestal (DISARZ e CORDER, 2009). Visando contornar os problemas oriundos da produção de mudas seminais, a utilização de técnicas de propagação vegetativa foi estabelecida para essa espécie, e é utilizada correntemente (ALFENAS *et al.*, 2009).

A podridão de estacas e miniestacas pode ocorrer na produção de mudas clonais de eucalipto (ALFENAS *et al.*, 2009). Em acácia-negra, a mesma doença foi constatada ocorrendo no único viveiro clonal de acácia-negra no Brasil, localizado em Triunfo/RS, com lesões escuras e apodrecimento de porção basal ou central da miniestaca, levando à sua morte (DUIN, AUER e HIGA, 2015).

Segundo Gonçalves (2014), o fator fitossanitário é importante na qualidade de mudas, pelos danos potenciais que as doenças causam nas etapas da produção de mudas florestais, sejam seminais ou clonais. O sucesso no enraizamento relaciona-se diretamente com a sanidade de estacas. O viveiro possui características que, em conjunto, auxiliam o surgimento e o desenvolvimento de doenças. Para sua prevenção, é de extrema importância que haja controle dos fatores que favoreçam o surgimento de fontes de inóculo e a disseminação de patógenos, como a água de irrigação, umidade relativa do ar, temperatura, substrato, e adensamento das mudas nas bandejas (GRIGOLETTI JUNIOR, AUER e SANTOS, 2001).

Por essas considerações, a necessidade de se conhecer os agentes causais da podridão de miniestacas de acácia-negra e suas fontes de inóculo estimulou o desenvolvimento deste trabalho.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Identificar os agentes causais da podridão de miniestacas de acácia-negra e sua origem.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Identificar os fungos associados com podridão de miniestacas de acácia-negra;
- ✓ Testar a patogenicidade dos principais fungos encontrados em miniestacas doentes;
- ✓ Identificar os fungos endofíticos a partir de miniestacas saudáveis;
- ✓ Identificar as fontes de inóculo de fungos associados com a podridão de miniestacas no viveiro.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A acácia-negra

A acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.), Família *Fabaceae*, Subfamília *Mimosoideae*, tem nomes comuns acácia-negra (Brasil) e “*black wattle*” (Austrália e África do Sul), referem-se à cor escura da casca e copa (KANNEGIESSER, 1990). É espécie pioneira, que apresenta como principais características a rápida colonização de ambientes abertos; requerimento de luz direta para germinação e crescimento; produção de grande quantidade de sementes que permanecem viáveis no solo por longo tempo; germinação rápida, mas que requer indução; rápido crescimento; e vida curta (SHERRY, 1971; BOLAND *et al.*, 1984; DEDECEK e HIGA, 2003).

A acácia-negra é considerada espécie recuperadora de solos degradados, pela capacidade de fixação simbiótica de N e deposição de serapilheira rica em nutrientes, melhorando as condições químicas, físicas e biológicas do solo (CARPANEZZI, 1998).

Devido a seu rápido crescimento e de sua habilidade de colonizar áreas que tenham perdido quase todo o solo superficial, a acácia-negra tem sido efetiva no controle da erosão e na melhoria da fertilidade do solo (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1980). Não apresenta restrição a tipos de solo, embora se desenvolva melhor em solos relativamente profundos, textura média e bem drenados; cresce em solos ácidos a neutro (pH 4,5 a 7,0) e de baixa fertilidade (SEARLE, 1997).

Desde o início da colonização australiana, os europeus reconheceram as características desta espécie, valorizando a madeira que proporcionava material para construções leves e para combustível; mais tarde, se começou a utilizar a casca como matéria prima para o curtimento das peles (BOLAND *et al.*, 1984).

Uma característica importante da acácia-negra é a casca, uma das mais ricas fontes conhecidas de tanino vegetal (ROUX, KEMP e WINGFIELD, 1995). *A. mearnsii* é uma das melhores espécies em termos de rendimento por árvore e de qualidade (composição e coloração) do tanino (SHERRY, 1971). De acordo com Maestri (1987), em plantações de acácia-negra no Rio Grande do Sul, com oito anos de idade, a estimativa do teor médio de tanino na casca é de 27% (porcentagem em casca seca).

A partir dos taninos também são produzidos adesivos para chapas de madeira e floculantes para tratamento de água, além de outros produtos como dispersantes,

resinas, quelantes e conservantes, na clarificação de cervejas e vinhos (SIMON, 2005; FOWLER *et al.*, 2000). O tanino é utilizado na produção de tintas, e também para produção de inibidores de corrosão, promotores de fluxo de líquidos em tubos e produtos farmacêuticos (SEIGER, 2002).

A madeira é fonte para vários usos. A madeira de acácia-negra vem sendo utilizada para produção de celulose, por apresentar menores teores de lignina que as espécies tradicionalmente utilizadas para este fim (MARTINEZ, 2006). Apresenta um alto poder calorífico, com as pontas de troncos, galhos e árvores mortas aproveitadas para lenha e produção de carvão (KANNEGIESSER, 1990). Hillig, Haselein e Santini (2002) reconheceram a madeira de acácia-negra como promissora para fabricação de chapas aglomeradas estruturais em mistura com *Pinus elliottii* e *Eucalyptus grandis*, trazendo vantagens para as propriedades mecânicas das chapas.

A acácia-negra, em sua área de ocorrência natural, possui fuste geralmente retilíneo quando em conjunto com outras árvores (BOLAND *et al.*, 1984). Em árvores mais jovens e na parte superior das árvores adultas, a casca é fina, lisa e de coloração clara. Em árvores adultas, geralmente apresenta-se com coloração preta-amarronzada, dura e fissurada. A folhagem adulta é de cor verde escura. As inflorescências são paniculares terminais ou axilares, composta por flores hermafroditas com coloração amarelo-creme claro, florescendo, na Austrália, entre outubro e dezembro. Os frutos são legumes mais ou menos retos, finamente peludos, comprimidos entre as sementes. Cada legume contém entre 1 e 14 sementes de cor negra. Sua madeira apresenta textura boa, durabilidade baixa a moderada, de alburno claro e cerne de cor marrom-clara com marcas avermelhadas, duro e resistente.

No Brasil e na África do Sul, a floração ocorre entre setembro e outubro (STEIN e TONETTO, 1997; SHERRY, 1971). Segundo MONCUR *et al.* (1989) o período médio de floração de cada árvore foi estimado em 20 dias. Estudos realizados por GRANT, MORAN e MONCUR (1994) confirmaram que a acácia-negra é alógama, com taxa de cruzamento natural superior a 90% e que as flores apresentam protoginia.

A acácia-negra possui ampla distribuição natural, especialmente em áreas costeiras de altitudes baixas nos estados de New South Wales e Victoria, no sudeste da Austrália e em altitudes baixas e intermediárias da Tasmânia. Sua localização varia entre latitudes de 34° a 43° S (BOLAND *et al.*, 1984) e altitudes que variam entre zero e 1070 m, mais comum em altitudes inferiores a 200 m (DORAN e TURNBULL, 1997).



Cresce na zona climática úmida a subúmida, fria a moderadamente quente, com média de temperatura máxima do mês mais quente entre 21 e 29 °C e média mínima entre -3 e 7 °C no mês mais frio. Raramente é encontrada em áreas que a temperatura excede aos 38 °C. A ocorrência de geadas varia entre 1 a 10 por ano nas áreas costeiras e chegando até 40 em alguns locais do planalto. As precipitações anuais ficam entre 450 a 1.600 mm, com 15 a 75 mm no mês de menor precipitação. Ocorre sobre uma topografia montanhosa suave e moderada, localizando-se, preferencialmente, nas faces leste e sul. Bom crescimento é observado em solos Podzólicos, moderadamente profundos (BOLAND *et al.*, 1984; SEARLE, 1997).

BOLAND *et al.* (1984) ressaltam que o tipo principal de vegetação onde a acácia-negra ocorre é a floresta aberta, mas também pode ocorrer em floresta aberta alta e savanas. As espécies de árvores dominantes são eucaliptos. Em todos os locais onde a acácia-negra ocorre, tem a tendência de ser o arbusto dominante, embora outros gêneros de acácias e arbustos possam estar presentes.

### 3.2. A cultura da acácia-negra no Brasil

A espécie foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul por Alexandre Bleckmann em 1918, em São Leopoldo/RS. Os primeiros plantios comerciais foram efetuados dez anos mais tarde em Estrela/RS, com sementes provenientes da África do Sul, para utilização da casca *in natura* em curtumes (OLIVEIRA, 1960, 1968; SCHNEIDER e TONINI, 2003). Acredita-se que todas as sementes utilizadas em plantios realizados até meados dos anos 80 tenham sido originadas desse material, pois não se tem nenhum registro de outra introdução de germoplasma (MORA, 2002).

A instalação de indústrias para o processamento de tanino a partir de 1941 promoveu uma expansão da acacicultura na região da Encosta da Serra Geral até o Vale do Jacuí, início da Depressão Central (FIGURA 1), atingindo em 1968 aproximadamente 50 mil hectares de área plantada (OLIVEIRA, 1968).

Segundo Mora (2002), a partir da década de 70 verificou-se uma expansão das plantações em direção ao sul do estado, atingindo em 1990 a parte sul da Depressão Central e a partir de 1990 a Encosta do Sudeste a Serra do Sudeste (FIGURA 1). Dados mais recentes, segundo IBÁ (2016), indicam que a área plantada do gênero *Acacia*, reunindo *A. mearnsii* e *A. mangium*, de 2010 para 2015, obteve um aumento de 26,04% totalizando 160.827 mil hectares no Brasil.

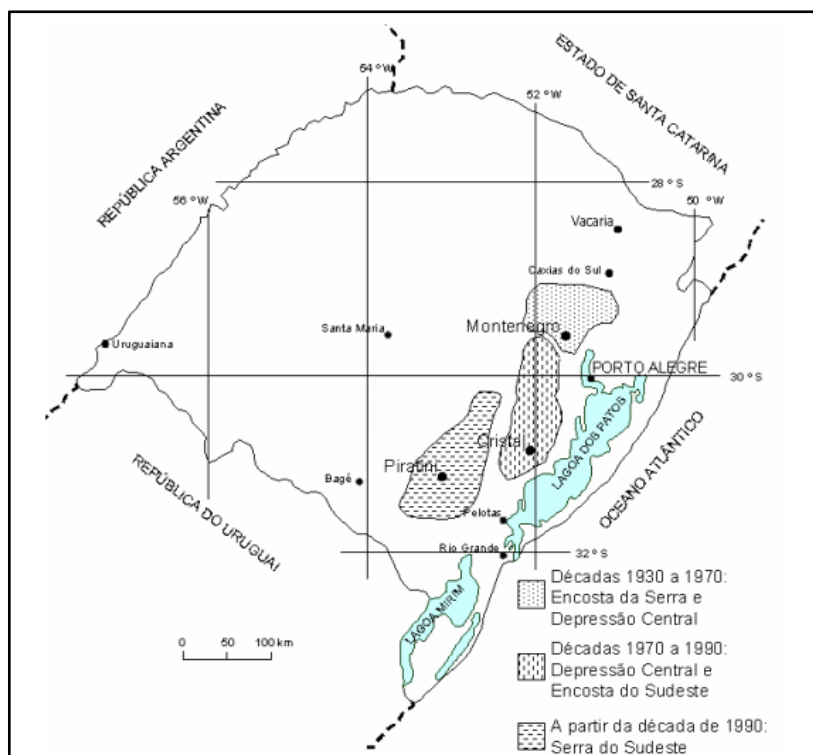


FIGURA 1 - EVOLUÇÃO DA ACACICULTURA NO RIO GRANDE DO SUL NO PERÍODO DE 1930 A 2000. FONTE: MORA, 2002.

No ano de 1983, um convênio foi firmado entre a Embrapa Florestas e a Tanac S.A. visando a realização de pesquisas com a acácia-negra buscando melhorar a qualidade e produtividade das plantações (MORA, 2002). Antes do convênio haviam problemas como: sementes coletadas em formigueiros; variação no crescimento entre as árvores plantadas; copas danificadas pelo cascudo serrador; árvores com gomose e sobrevivência em torno de 50% na idade de corte (MORA *et al.*, 2001).

A acacicultura é uma atividade econômica, há quase 90 anos, reconhecida por trazer consideráveis benefícios aos produtores, pela geração de renda, redução da jornada de trabalho, aproveitamento de áreas com uso restrito para agricultura e integração com outros cultivos agrícolas e com a pecuária (FLEIG, 1993; CONTO *et al.*, 1997). Na década de 1990, exercia grande importância social, pois cerca de 60% das plantações estão em pequenas propriedades, inseridas em diversos sistemas agrossilvipastoris beneficiando pelo menos 40 mil famílias em atividades ligadas a seu cultivo no Rio Grande do Sul (STEIN e TONIETTO, 1997).

A propagação vegetativa possui lugar especial no setor florestal, onde o seu uso econômico é justificado quando há disponibilidade de genótipos de alta produtividade e ou, se as sementes são insumos limitados (PIRES *et al.*, 2011).

No Brasil, a silvicultura intensiva clonal de eucalipto foi implantada no final da década de 1970, via coleta de brotações de cepas no campo e o enraizamento das estacas em casa de vegetação em condições ambientais controladas (PIRES *et al.*, 2011). Embora a acácia-negra, seja uma espécie plantada no Brasil desde o fim da década de 1920, a silvicultura clonal de acácia-negra não se desenvolveu até a última década e com isso os plantios apresentaram grande heterogeneidade, o que ressaltou a importância da pesquisa voltada para técnicas de regeneração via estacas e cultivo *in vitro* da espécie (FLÔRES JUNIOR, 2015). Segundo esse autor, a dificuldade da propagação vegetativa de acácia-negra está principalmente em estacas provenientes de minijardim clonal com fungos e os melhores resultados têm sido obtidos através de germinação *in vitro* de sementes de indivíduos selecionados.

### 3.3. Doenças em viveiros florestais

O êxito de um reflorestamento depende, em grande parte, da qualidade das mudas produzidas (NOVAES *et al.*, 2002). Porém, um dos principais entraves para a produção de mudas são as doenças de plantas que podem ocasionar perdas econômicas significativas. Segundo Agrios (2005), as doenças de plantas podem ser causadas por diversos microrganismos patogênicos, dentre eles, fungos, bactérias, vírus, protozoários e nematoides, e também por condições ambientais desfavoráveis.

O aspecto fitossanitário constitui um dos fatores mais preocupantes na fase de formação da muda, seja por sementes ou por estaquia. Doenças podem comprometer a produção das mudas, em todas as suas fases, assim como, o estabelecimento e desenvolvimento no campo (GONÇALVES, 2014).

Viveiros florestais estão sujeitos à ação de organismos fitopatogênicos devido à sua infraestrutura, onde há água em abundância, além de condições de elevada umidade relativa do ar, temperatura, substrato infestado, tecido vegetal tenro e proximidade das mudas, fatores que predispõem o aparecimento e favorecem o desenvolvimento de doenças. Para a prevenção de doenças em viveiros, é de extrema importância que haja controle desses fatores (GRIGOLETTI JÚNIOR, AUER e SANTOS, 2001). Os fatores citados acima aliados ao material vegetal fisiologicamente

debilitado pelas injúrias mecânicas da operação de preparo das estacas, perfazem um complexo extremamente favorável à atuação de fungos parasitas fracos causadores de lesões ou apodrecimento (FERREIRA, 1989).

O sucesso na obtenção de uma muda sadia depende, em grande parte, da qualidade do órgão propagativo que lhe deu origem. Sendo assim, sementes e estacas deverão estar em sua melhor condição de vigor e sanidade (GRIGOLETTI JÚNIOR, AUER e SANTOS, 2001). Segundo esses autores, os viveiros permanentes estão mais sujeitos aos problemas fitossanitários que os temporários, porque o cultivo contínuo em uma mesma área irá aumentar o inóculo.

Como exemplos de doenças ocorridas em viveiros de eucalipto temos: tombamento de mudas ou “damping-off”, podridão de estacas, podridão de raiz, manchas foliares de origem fúngica e/ou bacteriana, mofo cinzento, oídio e ferrugem (FURTADO *et al.*, 2001; ALFENAS e ZAUZA, 2007). Algumas dessas doenças podem ocorrer em viveiros de outras espécies florestais, como a acácia-negra.

A podridão de estacas é uma doença caracterizada por uma lesão escura que progride da base para o ápice da estaca, que avança sobre os tecidos, escurecendo-a por completo, provocando a morte das gemas e impedindo o enraizamento (SANTOS; AUER e GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001). Brotações doentes, substrato infestado, água contaminada, bandejas e tubetes contaminados, constituem as principais fontes de inóculo do patógeno a estacas e miniestacas durante o enraizamento (ALFENAS *et al.*, 2009).

Segundo Auer, Santos e Furtado (2016), a podridão de estacas em eucalipto pode ser causada por patógenos como *Cylindrocladium* spp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn e *Botryosphaeria ribis* Grossenb. & Duggar (sin. *Botryosphaeria dothidea* (Moug. & Fr.) Ces & de Not). Neste caso, podem ser encontradas as estruturas dos diferentes patógenos relacionados à podridão de estacas: frutificações branco-cristalinas de *Cylindrocladium*, estruturas marrom-avermelhadas de *Fusarium*, pontuações escuras (picnídios) de *B. ribis* ou acérvulos de *Colletotrichum* com ou sem massa alaranjada (SILVEIRA *et al.*, 2001).

Medidas de controle recomendadas à podridão de estacas em eucalipto visam a redução ou eliminação de inóculo através de métodos químicos, físicos e culturais, adicionalmente, deve-se tratar as estacas, caixas e recipientes com hipoclorito de sódio e/ou fungicida e realizar a limpeza total da casa de vegetação após um ou dois

ciclos de cultivo, utilizando-se hipoclorito de sódio ou sulfato de cobre (AUER, SANTOS e FURTADO, 2016).

### 3.4. Principais doenças em acácia-negra

Mundialmente, várias enfermidades têm sido registradas afetando a cultura da acácia-negra (ROUX, KEMP e WINGFIELD, 1995). Porém, apesar da importância da cultura da acácia-negra para o estado do Rio Grande do Sul, somente a partir da década de 1990 é que as principais doenças foram estudadas mais detalhadamente (SANTOS *et al.*, 2011).

A gomose é a principal doença da acácia-negra, apresentando como sintomas lesões necróticas na casca, de tamanhos variados e com exsudação ou não de goma, localizada no colo e ao longo do tronco, com maior severidade no segmento basal do tronco (SANTOS *et al.*, 2001a). Sotta *et al.* (1994) avaliando plantios comerciais, com oito anos de idade, encontraram 23% das árvores atacadas.

Santos, Auer e Grigoletti Júnior (1998) esclareceram a etiologia dessa doença, tendo como agente causal o oomiceto *Phytophthora*. Duas espécies foram identificadas como causadoras da gomose da acácia-negra no Brasil, Santos e Luz (2003) identificaram *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan e Santos, Luz e Souza (2004) identificaram *Phytophthora boehmeriae* Sawada.

Ainda em plantios, outras doenças foram relatadas. Santos e Ferreira (2002) relataram uma ferrugem em acácia-negra no Brasil, causada por *Uromycladium alpinum* McAlpine. O fungo causa leve amarelecimento e queda dos folíolos de árvores com dois anos de idade. Santos (2007) relatou a ocorrência de murcha e morte de árvores jovens causada por *Ceratocystis fimbriata* Ell. e Halst.

Em sementes, Santos *et al.* (2001b) encontraram os seguintes fungos em associação: *Botryodiplodia* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp. e outros fungos não identificados. Dentre os fungos potencialmente patogênicos, *Cylindrocladium* sp., *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp. não foram detectados em sementes autoclavadas, ocorrendo apenas nas sementes não autoclavadas. Fungos dos gêneros *Botryosphaeria*, *Ceratocystis*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Seiridium* e *Sphaeropsis* e o oomiceto *Phytophthora* foram relatados por Roux e Wingfield (1997), em sementes de acácia-negra na África do Sul, associados com gomose.

No viveiro, existem relatos de oídio causado por fungos do gênero *Oidium*. Os danos causados por esse fungo são severos e há relatos na Tailândia de mortalidade das mudas superior a 75% (OLD *et al.*, 2000). O ataque desse patógeno dá origem a folhas de limbo enrugado e afilado, podendo resultar em superbrotamento, com perda da qualidade da muda e até a morte (FERREIRA, 1989).

Mudas produzidas por via seminal podem apresentar tombamento de plântulas ou damping-off (FREDDO *et al.*, 2012), caracterizando-se por uma lesão na região do colo da muda, com aspecto encharcado, a destruição dos tecidos acaba provocando o tombamento da muda e sua morte (FERREIRA, 1989). Patógenos causadores dessa doença são *Botrytis* spp. e *Cylindrocladium* spp. (OLD *et al.*, 2000).

A mela causada por *R. solani* ocorre em vários hospedeiros lenhosos e não lenhosos. Relatos da doença em mudas em viveiros em regiões tropicais e subtropicais incluem *Acacia* spp., *Eucalyptus* spp., entre outros (OLD *et al.*, 2000).

Duin, Auer e Higa (2015) relataram a ocorrência de mortalidade de mudas seminais associada com sintomas de canela-preta, na forma de anelamento da haste que fica quebradiça e tomba, e podridão de miniestacas, caracterizada por lesões escuras e apodrecimento de porções da miniestaca. Entre os fungos presentes, destacaram-se *Cylindrocladium* sp., *Coniella* sp., *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização da área de estudo

O estudo foi conduzido no viveiro da empresa Tanac S. A. O viveiro está localizado na região de Triunfo/RS (29°56'36" S e 51°43'05" E), com altitude de 31 m a.n.m. (IBGE, 1990); na Zona Subtropical Sul. De acordo com a classificação de Köppen-Geiger:Aw, o clima predominante na região é do tipo Cfa, (subtropical úmido), com média anual de temperatura de 19 °C, precipitação média anual superior a 1800 mm e umidade relativa do ar superior a 70% (FERRARO e HASENACK, 2000).

A produção mensal média do viveiro é de 150 mil miniestacas. As mudas são produzidas a partir de miniestacas retiradas de minicepas do minijardim clonal (FIGURA 2). O minijardim clonal da empresa está implantado em canaletões de fibrocimento a céu aberto, com cobertura de estufim de plástico, em leito de areia preenchidos com brita no fundo. A irrigação é realizada utilizando um sistema automatizado de irrigação por gotejamento.

As mudas clonais são produzidas em tubetes de 53 cm<sup>3</sup> dispostos em bandejas de polipropileno com 11 x 17 células. Os tubetes são acondicionados de forma intercalada, sendo utilizada 50% da densidade da bandeja, sendo pré-lavados com jato de água quente, com pressão de até 150 bar e aquecimento até 80 °C. O substrato comercial é constituído de 50% de vermiculita média e 50% de casca de arroz carbonizada, fertilizado com 3 kg.m<sup>-3</sup> de Osmocote®, umedecido na betoneira.

As miniestacas são coletadas no minijardim, processadas e estaqueadas em um galpão. Posteriormente, são levadas à estufa para enraizamento, onde permanecem entre 30 e 45 dias, dependendo da época do ano. É neste período que ocorre a morte de miniestacas de acácia-negra (Figuras 3A e 3B).

A estufa é constituída de uma estrutura galvanizada, com plástico e luminete (50%) retrátil. As bandejas ficam suspensas a 90 cm do solo, sobre camada de brita para drenagem. Lavagem com jato de água fria e retirada dos musgos com água e hipoclorito de sódio 1% são feitos ao final de todo ciclo de produção. A irrigação da estufa é feita por nebulização intermitente (*fogger*). A água utilizada para a lavagem de tubetes e bandejas e para a irrigação é proveniente de poço artesiano.



FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE MUDA CLONAL NO VIVEIRO. FONTE: O autor (2017).



#### 4.2. Amostragem da podridão de miniestacas de acácia-negra

As coletas de plantas com sintomas, caracterizados por podridão basal ou podridão mediana da miniestaca (FIGURAS 3C e 3D), foram realizadas em duas épocas: setembro/2015 (1ª coleta) e março/2016 (2ª coleta). Foram selecionados três clones de interesse comercial da empresa, denominados como clone 1, clone 2 e clone 3. Para a avaliação da podridão de miniestacas, na primeira coleta foram coletadas 300 miniestacas por clone; na segunda coleta coletou-se 300 miniestacas dos clones 1 e 2, e, 200 miniestacas do clone 3 por causa da menor disponibilidade.

Para a coleta, toda a estufa foi percorrida, as miniestacas foram coletadas ao acaso, posteriormente foram embaladas em sacos plásticos limpos, identificadas e levadas para análise no laboratório (ALFENAS *et al.*, 2007).



FIGURA 3 – DETALHE DA MORTALIDADE DE MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA EM CASA DE VEGETAÇÃO. A: MORTALIDADE DE MINIESTACAS EM REBOLEIRA; B: MINIESTACA MORTA; C: MINIESTACA COM PODRIDÃO BASAL; D: MINIESTACA COM PODRIDÃO MEDIANA. FONTE: O autor (2017).

Com o objetivo de saber o início aproximado do apodrecimento, coletou-se aleatoriamente na estufa 20 miniestacas com 9 e 15 dias após a estaquia. Coletou-se também 50 miniestacas assintomáticas, sem discriminação de clone, para o isolamento de fungos endofíticos, essas miniestacas foram coletadas aleatoriamente no minijardim clonal. Todas as miniestacas coletadas foram embaladas em sacos plásticos limpos e levadas para análise no laboratório.

#### 4.3. Análises laboratoriais

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo/PR. No laboratório, foram usados três procedimentos para o isolamento: isolamento direto, isolamento indireto e isolamento de fungos endofíticos, seguindo metodologias de Alfenas *et al.* (2007) e Ferreira (1989).

a) Isolamento direto: as miniestacas sintomáticas foram mantidas em câmara úmida para induzir a formação das estruturas reprodutivas. Para confecção da câmara úmida, foram utilizadas caixas gerbox desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% e com duas folhas de papel mata-borrão esterilizadas em autoclave e umedecidas com água ultrapurificada estéril. As miniestacas foram dispostas sobre o papel umedecido, evitando o contato entre as mesmas, e a caixa gerbox foi recoberta com filme de P.V.C. As caixas permaneceram incubadas em luz fluorescente contínua e temperatura ambiente até formarem estruturas de reprodução que possibilitassem a identificação, por aproximadamente 10 dias.

b) Isolamento indireto: consistiu na retirada de fragmentos de tecido na região limítrofe entre o tecido sadio e o doente, que foram superficialmente desinfestados. Esse processo foi feito pela assepsia dos fragmentos por imersão em álcool 70% por 30 s e em hipoclorito de sódio 1% por 1 min, seguido de lavagem com água ultrapurificada estéril e deixados sobre papel mata-borrão estéril para retirar o excesso de água. Após a desinfestação, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura, sendo cinco fragmentos por placa. Utilizou-se o meio ágar-água com antibiótico (20 g de ágar em pó, 40 ppm de cloranfenicol e 80 ppm de ampicilina em 1000 mL de água ultrapurificada) e o meio batata-dextrose-ágar - BDA (39 g de produto comercial; água ultrapurificada 1000 mL). As placas foram mantidas em câmara de crescimento do tipo B.O.D., com temperatura de  $24 \pm 2$  °C, com ausência total de luz, por sete dias. Após o aparecimento de colônias fúngicas, discos de micélio foram transferidos para novas placas de meio BDA, para a obtenção de colônias puras, incubadas nas mesmas condições acima.

c) Isolamento de fungos endofíticos: para seu isolamento foi utilizada a técnica descrita por Araújo *et al.* (2002).

- i. Lavagem das amostras em água corrente;
- ii. Imersão em solução de álcool 70% por 1 min;
- iii. Imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 3 a 4 min;
- iv. Imersão em solução de álcool 70% por 30 s;
- v. Enxague por duas vezes em água ultrapurificada estéril.

Posteriormente à desinfestação das amostras, as mesmas foram fragmentadas com o auxílio de bisturi e os fragmentos, de aproximadamente cinco mm, foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas em câmara B.O.D a  $24 \pm 2$  °C, com ausência total de luz, por sete dias.

#### 4.4. Identificação dos fungos isolados

Para a purificação das culturas fúngicas (endofíticas e patogênicas), foi realizada a repicagem de fragmentos de micélio-ágar para placas com meio BDA, de forma a produzir colônias puras dos fungos isolados.

Para preparação de lâminas semipermanentes, foram utilizadas duas técnicas descritas em Mafia e Alfenas (2007). A primeira foi com lâmina e lamínula, coradas com solução de Amann (lactoglicerol mais azul de metileno). A segunda técnica utilizada foi a preparação de lâmina com fita adesiva, nos casos onde a estrutura de frutificação do fungo é de difícil coleta e que podia ser facilmente destruída. No centro da lâmina colocou-se uma gota de solução de Amann e em seguida cortou-se um pedaço de fita adesiva transparente, que tocou suavemente a frutificação do fungo. Em seguida, a fita foi colocada sobre a lâmina para observação.

Por meio da observação microscópica das lâminas foi realizada a identificação dos fungos, ao nível de gênero utilizando de descrições de fungos de Barnett e Hunter (1972). Para a confirmação das espécies, foi realizado o sequenciamento dos isolados para identificação molecular e comparação com sequências depositadas no *GenBank*. A identificação molecular dos isolados de *Cylindrocladium* foi realizada no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Lavras e dos isolados de endofíticos e de outros fungos no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LABMICRO) da Universidade Federal do Paraná.

A extração de DNA dos isolados foi realizada conforme protocolo descrito por Badali *et al.* (2009), e a reação de PCR utilizou os pares de oligonucleotídeos

iniciadores ITS1 e ITS4, que amplificam a região ITS1-5, 8S-ITS2 do DNA ribossomal (WHITE; BRUNS; TAYLOR, 1990).

A amplificação para as amostras seguiu as condições: 40 ng de DNA, tampão 1X, 0,03 U/ $\mu$ L de Taq polimerase, 0,5  $\mu$ M de iniciadores, 0,3 mM de dNTP, 2,5 mM de  $MgCl_2$  em um volume final de 25  $\mu$ L. A amplificação consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C e 30 s a 72 °C, e extensão final de 5 min a 72 °C.

A reação de sequenciamento foi feita em 10  $\mu$ L de reação, sendo 0,5  $\mu$ L de tampão para PCR, 0,5  $\mu$ L do iniciador (50 pmol), 0,5  $\mu$ L do *Big Dye* (*Applied Biosystems*), 1  $\mu$ L do produto de PCR (20 ng) e água ultrapura. Foram realizados 35 ciclos, cujas temperaturas são: desnaturação a 96 °C por 10 s, anelamento a 50 °C por 5 s, extensão a 60 °C por 4 min, e alongamento final a 60 °C por 60 s.

A precipitação foi realizada com isopropanol 75% à temperatura ambiente por 30 min, seguido por centrifugação por 30 min a 16000 x g. O pellet resultante foi ressuspensionado em formamida Hi-Di, e o sequenciamento foi realizado no equipamento *ABI 3500 automatic sequencer* (*Perkin-Elmer, Massachusetts, USA*).

As sequências foram editadas utilizando-se o programa Staden (BONFIELD *et al.*, 2002), e alinhadas utilizando a máxima similaridade por meio do editor de sequência MEGA 7 (KUMAR *et al.*, 2016). Em seguida, foram comparadas com o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information website).

As culturas obtidas foram preservadas em tubos inclinados com meio BDA recobertas com óleo mineral; e em vidros de penicilina contendo água ultrapurificada estéril e lacrado com selos de alumínio (método de Castellani), que foram identificados e conservados em sala com temperatura controlada (GONÇALVES, ALFENAS e MAFIA, 2007). Os isolados encontram-se depositados na coleção de Fungos Fitopatogênicos Florestais da Embrapa Florestas, Colombo/PR.

#### 4.5. Aplicação dos Postulados de Koch e teste de agressividade

Testou-se a patogenicidade de isolados de fungos que apresentaram maior incidência em associação com a podridão de miniestacas de acácia-negra. Discos de micélio-ágar de sete mm de diâmetro, retirados de culturas em meio BDA (ALFENAS *et al.*, 2007), com sete dias de idade em câmara B.O.D. a  $24 \pm 2$  °C, com ausência

total de luz, foram inoculados na base de miniestacas sadias de acácia-negra, com cerca de 10 cm de comprimento

Na preparação das miniestacas, estas foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 30 s e hipoclorito de sódio 1% por 1 min. Para cada fungo, foram inoculadas 24 miniestacas, por clone. Como tratamento testemunha, as miniestacas foram inoculadas com discos de meio BDA.

As miniestacas inoculadas foram incubadas em caixas gerbox com papel mata-borrão estéril umedecido, mantidos sob luz fluorescente contínua, em temperatura ambiente, por sete dias, quando se realizou a avaliação e o reisolamento. Na avaliação, verificou-se a presença de sintomas, ou seja, podridão nas miniestacas e mediu-se, com o auxílio de paquímetro, o comprimento da lesão. O reisolamento consistiu no isolamento indireto dos fragmentos de cada miniestacas em meio BDA e incubados em câmara B.O.D. a  $24 \pm 2$  °C, com ausência total de luz. Os fungos reisolados foram comparados com as culturas originais.

Para testar a agressividade, utilizou-se quatro isolados do fungo que produziu maior lesionamento nas miniestacas. A agressividade foi avaliada pelo comprimento da lesão (cm) nas miniestacas inoculadas, medido com auxílio de paquímetro. O teste seguiu os mesmos procedimentos apresentados acima e o reisolamento e avaliação foram realizados cinco dias após a inoculação (ALFENAS *et al.*, 2007).

#### 4.6. Identificação de fontes de inóculo

Visando encontrar as fontes de inóculo de patógenos, foi realizada a coleta de: minicepas doentes dos jardins clonais; brotações aparentemente sadias; brotações com lesões escuras; amostras do substrato utilizado para o enraizamento das miniestacas; água utilizada para a irrigação; areia proveniente dos canaletões dos minijardins; de tubetes; e britas provenientes da estufa. As amostras foram embaladas em sacos plásticos limpos, lacrados, identificados, levados ao laboratório e mantidas em refrigeração a 6 °C no máximo por dois dias, antes do processamento.

a) Minicepas: cinco minicepas doentes do minijardim clonal do viveiro foram coletadas, ao acaso, nos canaletões, para isolamento direto. Fragmentos de minicepas foram separados em duas porções: ápice (região de coleta de brotações) e do caule (parte basal). As raízes não foram consideradas.

b) Brotações: Cinquenta brotações assintomáticas foram coletadas ao acaso em todo o minijardim clonal e isoladas pelo método direto. Quinze brotações com lesões escuras, coletadas no minijardim clonal onde se verificou a ocorrência do sintoma foram isoladas pelo método indireto.

c) Substrato: o substrato novo, descrito no item 4.1, foi coletado diretamente de embalagens ainda fechadas, armazenadas em galpão do viveiro, de onde coletou-se cinco amostras. Para isolar os fungos do substrato, foi utilizada a técnica de diluição em série descrita em Mello *et al.* (2011). Diluiu-se 10 g de substrato em 90 mL de água, consistindo na primeira diluição, a qual passou por processo de agitação manual e a seguir, espalhou-se 100 µL da diluição na superfície de placas de Petri contendo meio de Martin (5 g de peptona; 0,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1 g de  $K_2HPO_4$ ; 10 mL de solução de rosa bengala na concentração de 1:300; 30 mg de sulfato de estreptomicina; 10 g de dextrose; e 20 g de ágar-ágar para 1000 mL de água ultrapurificada). Da primeira diluição foram retirados 1 mL e diluídos em 9 mL de água, sendo essa a segunda diluição. O mesmo procedimento foi empregado sucessivamente para completar as séries de diluições: 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000. De cada diluição foram feitos três plaqueamentos (repetições). As placas foram incubadas em câmara B.O.D. a  $24 \pm 2$  °C com ausência total de luz até a formação de colônias. Após esse período, fez-se a identificação dos fungos presentes.

Além da diluição em série, realizou-se também teste de isca com folha de mamona (*Ricinus communis* L.) e com folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage para verificar a presença de *Cylindrocladium* sp. no substrato (FIGURA 4). Nesse teste utilizou-se dois tipos de substrato: substrato novo e substrato usado. O substrato usado foi retirado diretamente de tubetes que continham miniestacas com podridão. Coletou-se cinco amostras de cada tipo, cada amostra foi composta pelo conteúdo de cinco tubetes. O teste foi implantado em caixas gerbox com duas folhas de papel mata-borrão esterilizadas em autoclave e umedecidas com água ultrapurificada estéril. O substrato possivelmente contaminado foi umedecido com água ultrapurificada estéril e colocado sobre as folhas, sendo o limbo da folha perfurado para a liberação da enzima estimulante ao fungo (ALFENAS *et al.*, 2007). O material permaneceu em câmara úmida em estante com luz fluorescente contínua e temperatura ambiente por cinco dias.



FIGURA 4 - TESTE COM ISCAS PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Cylindrocladium* sp. EM SUBSTRATO. A: ISCA COM FOLHA DE MAMONA. B: ISCA COM FOLHAS DE *Eucalyptus benthamii*. FONTE: O autor (2017).

d) Água de irrigação: a detecção foi realizada por meio da diluição em série, com os mesmos procedimentos descritos para a diluição do substrato. A água foi coletada do reservatório que abastece o viveiro e dos bicos da irrigação no interior da estufa, coletando-se três amostras de cada situação.

e) Areia: a detecção foi realizada por meio da diluição em série, com os mesmos procedimentos descritos para a diluição do substrato. Cinco amostras de areia foram coletadas nos locais onde foram retiradas as minicepas doentes nos minijardins clonais.

f) Tubetes: avaliou-se a presença de fungos fitopatogênicos em tubetes usados (tubetes coletados no interior da estufa, os quais apresentavam miniestacas com podridão) e tubetes lavados (tubetes lavados com alta pressão em água quente). Os tubetes usados foram os mesmos esvaziados para coleta do substrato usado; os tubetes lavados foram coletados aleatoriamente logo após a lavagem, coletou-se nove tubetes de cada situação. A metodologia consistiu lavagem de tubetes em copo de Béquer esterilizado por autoclavagem com 20 mL de água estéril. Os tubetes foram lavados com o auxílio de uma escova previamente esterilizada por 1 min em hipoclorito de sódio 1% e enxaguados em água estéril. A partir da solução da lavagem, alíquotas foram coletadas com micropipeta em doses de 10 e 100  $\mu$ L da diluição e espalhadas na superfície de placas de Petri contendo meio de Martin. Foram utilizados nove tubetes de cada tratamento (usados e lavados), cada diluição teve três

repetições (placas). As placas foram incubadas conforme descrito para o isolamento de fungos do substrato.

g) Britas: para a análise da presença de patógenos coletou-se três amostras no solo da casa de vegetação, sob mesas suspensas com presença de reboleiras de podridão de miniestacas. De cada amostra, pesou-se 10 g, as quais foram lavadas em 90 mL de água esterilizada. Posteriormente, fez-se a separação dos resíduos maiores por meio de peneira plástica esterilizada. Espalhou-se alíquotas de 10 e 100 µL da diluição na superfície de placas de Petri contendo meio de Martin. O isolamento foi realizado em três porções de britas, em cada diluição realizou-se três repetições (placas). As placas foram incubadas conforme descrito para o isolamento de fungos do substrato.

#### 4.7. Tratamento estatístico dos dados

Colônias de fungos dos fragmentos plaqueados em meio de cultura foram contadas para o cálculo da frequência de cada gênero. Calculou-se o intervalo de confiança ao nível de 5% para os dados de frequência de colônias de fungos da primeira e segunda coletas, utilizando-se fórmula descrita por Altman (1991):

$$IC = t * \sqrt{\frac{\left(\frac{P}{100}\right) \left(1 - \frac{P}{100}\right)}{n}}$$

Em que:

IC = intervalo de confiança

$t = 1,96$

$P$  = porcentagem

$n$  = número de repetições

Os dados de patogenicidade e agressividade foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Bartlett, análise de variância (ANOVA) e comparou-se as médias pelo teste de Tukey a 5%. O programa utilizado nas análises estatísticas foi o ASSISTAT Versão 7.7 beta, 2016 (SILVA e AZEVEDO, 2016).



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Fungos presentes em miniestacas de acácia-negra com podridão

Na primeira coleta, foram isolados nove gêneros de fungos: *Botryosphaeria*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Clonostachys*, *Graphium*, *Monilia*, *Monochaetia*, *Pestalotiopsis* e *Coniella* (TABELA 1). *Cylindrocladium* sp. foi o fungo de maior incidência média (69,7%) para todos os clones estudados, seguido por *Clonostachys* (12,5%), *Botryosphaeria* (5,4%), *Pestalotiopsis* (5,2%) e *Fusarium* (2,1%).

Na segunda coleta foram isolados oito gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Clonostachys*, *Pestalotiopsis*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma* (TABELA 1). *Cylindrocladium* sp. foi o fungo que apresentou maior incidência média (76%) em todos os clones estudados, seguido por *Clonostachys* (7,5%), *Colletotrichum* (4,4%), *Rhizoctonia* (4,3%) e *Fusarium* (1,9%).

Aos nove dias, após a estaquia, as miniestacas não possuíam lesões visíveis e aos 15 dias havia apodrecimento. A partir do isolamento de fragmentos dessas miniestacas, verificou-se alta frequência de *Cylindrocladium* sp. Fungos do gênero *Cylindrocladium* destacam-se como patógenos de *Pinus* e *Eucalyptus*, levando a problemas como tombamento de plântulas, podridão de estacas, estrangulamento do caule, podridão de raízes e, no caso de *Eucalyptus*, a ocorrência de manchas foliares (APARECIDO e FINATTI, 2012). Em eucalipto, as espécies *C. candelabrum* Viégas, *C. scoparium* Morgan, *C. gracile* (Bugn.) Boesew. (= *C. clavatum* Hodges & May), *C. parasiticum* Crous, Wingfield & Alfenas, *C. pteridis* F.A. Wolf e *C. ovatum* El-Gholl (ALFENAS et al., 2009) e *C. ilicicola* Boedijn & Reitsma (FERREIRA E MILANI, 2012) são causadoras de podridão de estacas no Brasil. Em *Pinus*, *Calonectria brachiatica* L. Lombard, M.J. Wingf. & Crous e *Calonectria brassicae* Pamwar & Bohra (teleomorfos de *Cylindrocladium*) foram associados a podridão de estacas enraizadas de *Pinus maximinoi* e *P. tecunumanii*, na Colômbia (LOMBARD et al., 2009).

TABELA 1 - FUNGOS ISOLADOS DE MINIESTACAS DE TRÊS CLONES DE ACÁCIA-NEGRA (PRIMEIRA COLETA – SETEMBRO/2015; SEGUNDA COLETA – MARÇO/2016), TRIUNFO/RS.

ISOLADO	REISOLAMENTO (%)							
	1º COLETA				2ª COLETA			
	CLONE 1	CLONE 2	CLONE 3	MÉDIA	CLONE 1	CLONE 2	CLONE 3	MÉDIA
<i>Cylindrocladium</i> sp.	76,1 ± 4,8 <sup>(1)</sup>	37,3 ± 5,2	95,7 ± 2,3	69,7	73,5 ± 6,1	78,8 ± 4,5	75,7 ± 5	76
<i>Clonostachys</i> sp.	7,2 ± 2,9	28,6 ± 4,9	1,7 ± 1,5	12,5	9,8 ± 4,1	9,1 ± 3,1	3,5 ± 2,1	7,5
<i>Botryosphaeria</i> sp.	6,2 ± 2,7	9,3 ± 3,1	0,7 ± 0,9	5,4	-	-	-	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	-	-	5,9 ± 3,2	2,5 ± 1,7	4,9 ± 2,5	4,4
<i>Rhizoctonia</i> sp.	-	-	-	-	7,8 ± 3,7	4,1 ± 2,2	1,0 ± 1,2	4,3
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2,6 ± 1,8	11,7 ± 3,5	1,3 ± 1,3	5,2	-	-	1,4 ± 1,4	1,4
<i>Fusarium</i> sp.	-	2,1 ± 1,5	-	2,1	1,0 ± 1,4	0,9 ± 1,1	3,8 ± 2,2	1,9
<i>Coniella petrakii</i>	1,0 ± 1,1	-	-	1	-	-	-	-
<i>Graphium</i> sp.	-	0,3 ± 0,6	-	0,3	-	-	-	-
<i>Monilia</i> sp.	-	0,3 ± 0,6	-	0,3	-	-	-	-
<i>Monochaetia</i> sp.	-	0,3 ± 0,6	-	0,3	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,6	-	0,3
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,6	-	0,3
Fungos não identificados	7 ± 2,8	9,9 ± 3,2	0,7 ± 0,9	5,9	2 ± 1,9	4,1 ± 2,2	9,7 ± 3,4	5,3

<sup>(1)</sup> Intervalo de confiança ao nível de  $p < 0,05$ .

Em isolamento direto de miniestacas mortas e com podridão identificou-se *Cylindrocladium* sp. e *Fusarium* sp. (FIGURA 5). *Fusarium* sp. é visualizado com uma esporulação branca sobre os tecidos mortos, enquanto que *Cylindrocladium* sp. produz peritécio alaranjado de *Calonectria*.

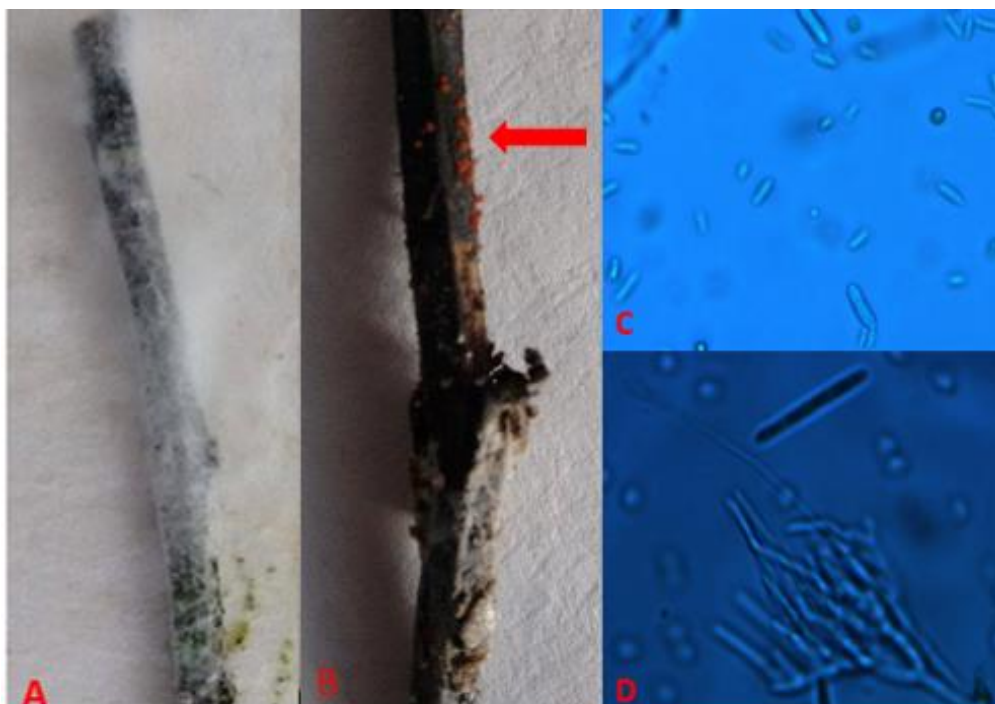


FIGURA 5 - ISOLAMENTO DIRETO DE MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA MORTAS E COM PODRIDÃO. A: MINIESTACA COM MICÉLIO DE *Fusarium* sp. B: MINIESTACA COM PERITÉCIOS (SETA) DA FASE TELEOMÓRFICA DE *Cylindrocladium* sp. C: CONÍDIOS DE *Fusarium* sp. D: CONIDIÓFORO E CONÍDIOS DE *Cylindrocladium* sp. FONTE: O autor (2017).

*Fusarium* spp. foram associados com a morte de estacas de erva-mate, além de *Colletotrichum* sp. e *Ceratocystis minuta* (Siem.) Hunt (AUER, GRIGOLETTI JUNIOR E MASCHIO, 1995). Segundo Vitti; Krüger e Vieira (1989) patógenos primários (*Cylindrocladium* spp., *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani*) e patógenos secundários (*Colletotrichum* spp.) podem estar envolvidos no processo podridão de estacas de *Eucalyptus* spp. Auer e Santos (2010) mencionaram também o patógeno secundário *Botryosphaeria ribis* à podridão de estacas de eucalipto.

A ocorrência de patógenos secundários pode ser explicada pelo fato de que vários fungos atuam como saprófitas e surgem após o início da senescência do material vegetal. Assim podem ser observados outras espécies de fungos associadas à morte de estacas (CARVALHO; ALFENAS e DEMUNER, 1989; FERREIRA, 1989).

Na segunda coleta, *Rhizoctonia* sp. foi detectada em todos os clones de acácia-negra (TABELA 1). Esse fungo foi isolado somente na coleta realizada no verão (março/2016), época mais quente do ano. Além de acácia-negra, *R. solani* foi relatada como agente causal da podridão de miniestacas enraizadas de *Pinus caribaea*, *P. tecunumanii* e híbridos entre essas duas espécies (FERREIRA, MENDES e MAIA, 2005) e *Rhizoctonia* sp. com a podridão de miniestacas em *E. benthamii* (SCHULTZ, 2011) demonstrando a sua associação com espécies florestais.

Uma espécie de *Coniella* isolada somente no clone 1 foi identificada como *Coniella petrakii* B. Sutton (SUTTON, 1980), porém sua associação com a podridão de miniestacas é incerta. Este fungo também foi encontrado em lesões em troncos de árvores de acácia-negra com gomose por Sotta e Auer (1995). Com relação a *Pestalotiopsis* sp., não foram encontrados relatos de sua ocorrência associada com podridão de miniestacas em espécies florestais.

As espécies de *Trichoderma* são fungos filamentosos, habitantes naturais do solo e da rizosfera em diversos tipos de solos no mundo (HARAN *et al.*, 1996). A presença de *Trichoderma* nesse levantamento é importante para a miniestaquia pois, segundo Lucon (2008), além de controlarem doenças causadas por outros microrganismos, atuam promovendo o crescimento de plantas, pelo aumento na disponibilidade de nutrientes e produção de hormônios de crescimento.

O gênero *Clonostachys* é conhecido pelas espécies que parasitam hifas de outros fungos, sendo usados como agente de controle biológico, e por promover o crescimento de plantas (SUTTON *et al.*, 2008).

Verificou-se, também, ocorrência diferenciada em relação às épocas de coleta, mais fria (setembro/2015) e mais quente (março/2016). Na primeira coleta, observou-se *Botryosphaeria* sp., *Coniella petrakii*, *Graphium* sp., *Monilia* sp. e *Monochaetia* sp. Na segunda coleta, detectou-se *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Trichoderma* sp. *Pestalotiopsis* sp. ocorreu nas duas épocas, porém com maior incidência na época fria e somente em um clone da época quente. As frequências médias de *Fusarium* sp. foram muito próximas, presente em todos os clones em março/2016 e somente em um clone em setembro/2015. Com relação a *Cylindrocladium* sp. e *Clonostachys* sp. não houve distinção entre as épocas, ocorrendo com alta frequência nas duas amostragens. No caso de *Cylindrocladium* sp., resultado similar foi relatado por Cabel (2014) em miniestacas de eucalipto em casa de vegetação no Rio Grande do Sul. Ferreira (1989) considerou que a

temperatura relativamente elevada mantida no interior das casas de vegetação, a umidade excessiva e as injúrias da operação de estaquia, favorecem a atuação de fungos parasitas causadores de lesões ou apodrecimento.

## 5.2. Fungos endofíticos em miniestacas de acácia-negra

Vinte e nove fungos endofíticos foram isolados (TABELA 2), desses 21 foram identificados por métodos moleculares. Foram confirmadas as espécies *Colletotrichum gloesporioides* Penz., *Diaporthe inconspicua* R.R. Gomes, C. Glienke & Crous, *Eutypella scoparia* Schwein., *Sporobolomyces carnicolor* Yamasaki & H. Fujii ex F.Y. Bai & Boekhout, *Neopestalotiopsis clavispora* (G.F. Atk.) Maharachch., K.D. Hyde & Crous e *Papiliotrema fuscus* J.P. Samp., J. Inácio, Fonseca & Fell., dos quais *P. fuscus* e *S. carnicolor* não estão associados com espécies florestais e somente *D. inconspicua* seria endofítico (FARR e ROSSMAN, 2017).

TABELA 2 – FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE MINIESTACAS SADIAS DE ACÁCIA-NEGRA SETEMBRO/2015, TRIUNFO/RS.

ISOLADO	NÚMERO DE ISOLADOS	FREQUÊNCIA (%)	Nº ACESSO GENBANK	
<i>Colletotrichum</i> sp.	2	7	KY962997	KY962998
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	4	14	KY962993	KY962995
			KY962994	KY962996
			KY962982	KY962986
<i>Diaporthe</i> sp.	6	21	KY962983	KY962987
			KY962984	KY962988
<i>Diaporthe inconspicua</i>	1	3	KY962985	
<i>Eutypella scoparia</i>	1	3	KY962999	
<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	1	3	KY962981	
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	2	7	KY962989	KY962990
<i>Papiliotrema fuscus</i>	2	7	KY962979	KY962980
<i>Phoma</i> sp.	2	7	KY962991	KY962992
Fungos não identificados	8	28	-	

Apesar da alta frequência de *Cylindrocladium* sp. em miniestacas com podridão, nenhum isolado endofítico foi obtido. Contudo, pode ser endofítico em raízes de graviola (SILVA *et al.*, 2006). *Colletotrichum* sp. e *Pestalotiopsis* sp. foram isolados em miniestacas com podridão, podem ser as mesmas espécies endofíticas encontradas. Sbravatti Junior *et al.* (2013) isolaram *Pestalotiopsis* sp. como endofítico em segmentos de hastes de mudas seminais de *E. benthamii*. Nenhum dos fungos endofíticos isolados foram associados com acácia-negra (FARR e ROSSMAN, 2017).

A identificação de fungos endofíticos é importante pois, segundo Auer e Santos (2010), brotações sem sintomas, com infecção latente ou endofítica de patógenos secundários no jardim clonal, como *Colletotrichum* sp., podem causar podridão em casa de vegetação, após o estresse provocado pela estaquia.

### 5.3. Patogenicidade de fungos em miniestacas de acácia-negra

Os isolados testados foram identificados como: *Calonectria polizzii* L. Lombard, Crous & M.J. Wingf. (números de acesso GenBank KY984058 – CY-3, KY984059 – CY-4, KY984060 – CY-5 e KY984062 – CY-8), *Fusarium* sp. (ainda não depositado no GenBank), *Fusarium oxysporum* Schltdl (números de acesso GenBank - KY810792 e KY810793), *Neopestalotiopsis clavispora* (G.F. Atk.) Maharachch., K.D. Hyde & Crous. (número de acesso GenBank - KY810807) e *Rhizoctonia solani* Kuhn (número de acesso GenBank - KY810803). Os isolados denominados como *Cylindrocladium* sp. foram renomeados para *C. polizzii*.

Nas miniestacas inoculadas com *C. polizzii* e *N. clavispora* as lesões progrediram para podridão. Nas inoculadas com *Fusarium* spp. e *R. solani*, ocorreu crescimento epifítico, as lesões ocorreram somente na base da miniestaca, sendo impossível avaliar o comprimento da lesão. *Fusarium* spp. e *R. solani* não foram considerados patogênicos e *C. polizzii* e *N. clavispora* foram considerados patogênicos. Esse crescimento epifítico de *R. solani* foi constatado para hastes de eucalipto (BROWN e FERREIRA, 2000). Contrariamente, Carvalho; Alfenas e Demuner (1989) comprovaram a patogenicidade de *C. scoparium*, *C. clavatum*, e também de *Rhizoctonia* spp. e *Fusarium* spp. em estacas de eucalipto. Além das miniestacas de acácia-negra, somente Auer e Sotta (1995) demonstraram que *C. candelabrum* foi patogênico em acácia-negra formando lesões na casca de árvores.

No sétimo dia após a inoculação, observou-se que 100% das miniestacas exibiam os mesmos sintomas constatados no viveiro em Triunfo/RS, na forma de lesões escuras e podridão e as testemunhas não tinham sintomas (FIGURA 6).

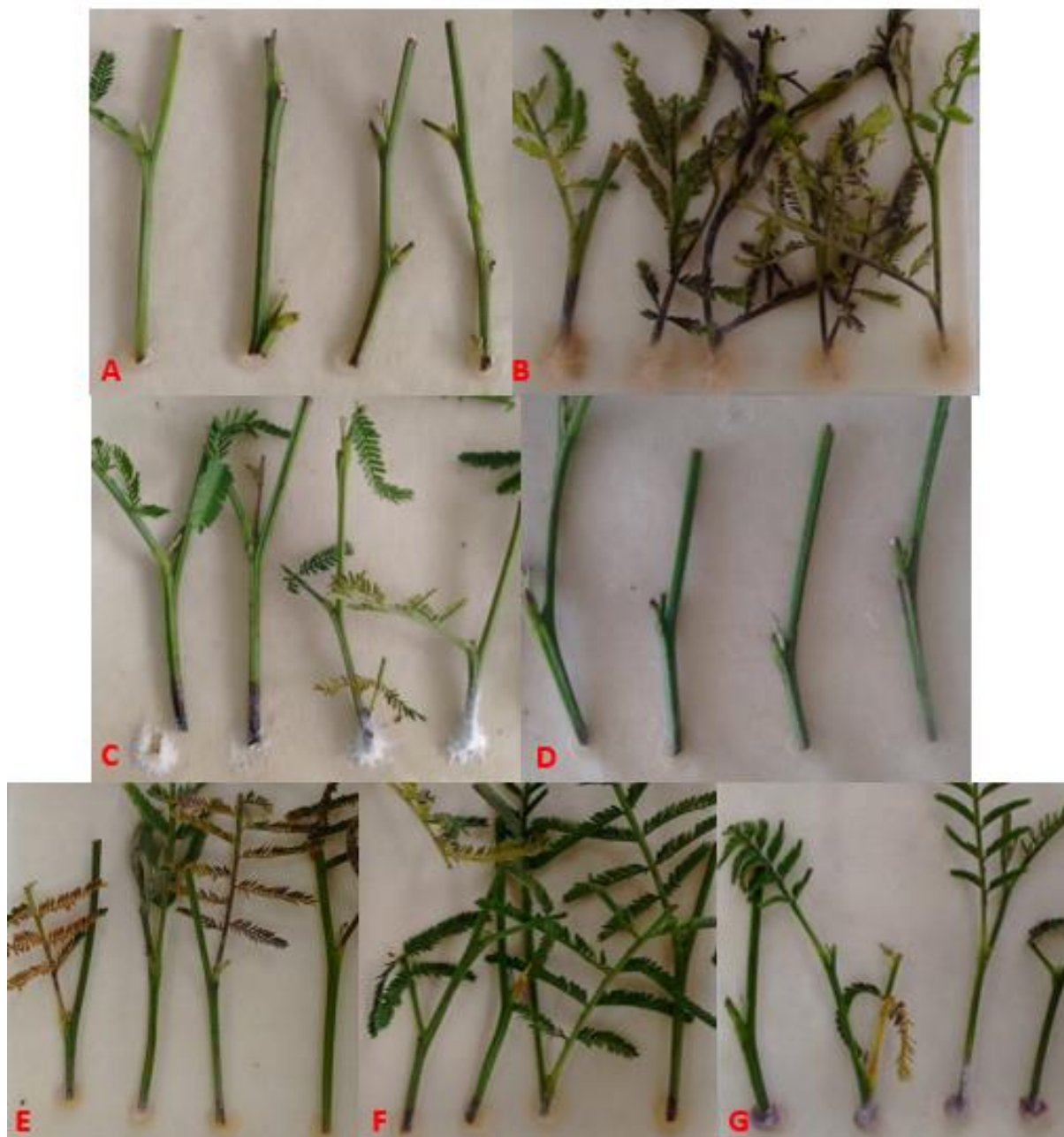


FIGURA 6 - PATOGENICIDADE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS EM MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA. A: MINIESTACAS SEM LESÕES - TESTEMUNHA. B: APODRECIMENTO CAUSADO POR *Calonectria polizzii*. C: APODRECIMENTO CAUSADO POR *Neopestalotiopsis clavispora*. D: MINIESTACAS COLONIZADAS POR *Rhizoctonia solani*. E: MINIESTACAS COLONIZADAS POR *Fusarium oxysporum* (isolado 1). F: MINIESTACAS COLONIZADAS POR *Fusarium oxysporum* (isolado 2). G: MINIESTACAS COLONIZADAS POR *Fusarium* sp. (isolado 3). FONTE: O autor (2016).

Quanto ao tamanho das lesões, houve diferença significativa entre clones e os isolados *C. polizzii* e *N. clavispora* (TABELA 3). O clone 3 foi mais suscetível do que os outros dois clones, provavelmente com menor enraizamento no viveiro. Na média geral, os clones foram mais susceptíveis ao ataque de *C. polizzii* do que *N. clavispora*. Houve recuperação de *C. polizzii* e *N. clavispora*, cujas frequências variaram de 71 a 97 % (TABELA 3).

TABELA 3 - COMPRIMENTO MÉDIO (MM) DO APODRECIMENTO E RECUPERAÇÃO (%) DAS MINIESTACAS APÓS SETE DIAS DA INOCULAÇÃO DE *Calonectria polizzii* e *Neopestalotiopsis clavispora*.

CLONE	<i>Calonectria polizzii</i>		<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	
	COMPRIMENTO MÉDIO (mm)	RECUPERAÇÃO (%)	COMPRIMENTO MÉDIO (mm)	RECUPERAÇÃO (%)
1	27,01 b	71	22,97 b	80
2	28,72 b	79	16,40 b	97
3	44,53 a	88	31,90 a	77
CV (%)	46,14		62,61	
Média	33,44 A		23,24 B	
CV (%)			58,68	

Médias seguidas, por letras minúsculas distintas na coluna, e por letras maiúsculas distintas na linha, diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Diferenças quanto à severidade da podridão de estacas de eucalipto foram observadas por Paradela, Bebendo e Krügener (1999), inoculando *Botryosphaeria* sp., *Colletotrichum* sp. e *Cylindrocladium* sp. em um híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*. Essa variação entre os clones de acácia-negra, poderia ser explicada pela variação da suscetibilidade do hospedeiro, a exemplo do patossistema *Cylindrocladium-Eucalyptus* (ALFENAS, 1986).

Em relação à agressividade de isolados de *C. polizzii* causando podridão de miniestacas de acácia-negra, não foi possível observar diferença significativa no tamanho das lesões entre os isolados (TABELA 4). Os isolados causaram lesão em todas as miniestacas, comprovando sua patogenicidade, com reisolamento variando de 96 a 100%.



TABELA 4 - COMPRIMENTO DE LESÃO (CM) E REISOLAMENTO (%) DE ISOLADOS DE *Calonectria polizzii* APÓS CINCO DIAS DE INOCULAÇÃO EM MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA.

ISOLADO	COMPRIMENTO MÉDIO (MM)	REISOLAMENTO (%)
CY - 3	14,5 a	96
CY - 4	13,2 a	96
CY - 5	13,6 a	100
CY - 8	13,4 a	100
CV (%)	30,33	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

#### 5.4. Fontes de inóculo

Fungos fitopatogênicos não foram encontrados nas minicepas. Nove gêneros de fungos foram isolados das brotações assintomáticas (TABELA 5), destacando-se *Cylindrocladium* sp. Em média, 40 % das brotações assintomáticas apresentaram algum fungo, após 15 dias em câmara úmida e todas as brotações com lesões escuras, apresentaram *Cylindrocladium* sp. No caso de estacas assintomática de um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, Paradela, Bedendo e Krüger (1999) encontraram *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Cylindrocladium* sp. e *Fusarium* sp. Assim, brotações assintomáticas com lesões imperceptíveis a olho nu podem ser fontes de inóculo, pois na casa de vegetação as lesões se desenvolvem com posterior produção de esporos que serão disseminados a pequenas e longas distancias (BROWN e FERREIRA, 2000).

No caso dos tubetes lavados e usados (TABELA 5), praticamente os mesmos fungos foram verificados, indicando falhas no processo de higienização e desinfestação desse material. *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. isolados de miniestacas com apodrecimento também foram isolados de tubetes, indicando que esse material pode ser fonte de inóculo desses patógenos.

Segundo Alfenas *et al.* (2009), os tubetes devem ser previamente lavados com jatos de água sob pressão para remover ao máximo os resíduos de substrato e, posteriormente, devem ser desinfestados por imersão em água quente à 70 °C por 3 min ou 80 °C por 30 s. Ainda segundo esse autor, a desinfestação térmica dos tubetes pode favorecer o aumento do índice de enraizamento e da massa do sistema radicular, provavelmente por eliminar substâncias termolábeis que interferem na rizogênese. De

acordo com o método utilizado no viveiro, pode ser que a limpeza dos tubetes não está sendo eficiente.

A presença de *Cylindrocladium* nas britas mostra o risco de disseminação desse fungo do piso da casa de vegetação para as miniestacas na mesa suspensa (FERREIRA, 1989) e sua capacidade de sobreviver em vários ambientes (APARECIDO e FINATTI, 2012), fazendo desse local uma fonte de inóculo.

TABELA 5 – POSSÍVEIS FONTES DE INÓCULO PARA FUNGOS EM VIVEIRO COM PODRIDÃO DE MINIESTACAS DE ACÁCIA-NEGRA. MARÇO/2016, TRIUNFO/RS.

FUNGOS ENCONTRADOS	FONTE DE INÓCULO			
	BROTAÇÕES ASSINTOMÁTICAS <sup>(1)</sup>	TUBETES LIMPOS <sup>(2)</sup>	TUBETES SUJO <sup>(3)</sup>	BRITAS <sup>(4)</sup>
<i>Aspergillus</i> sp.	+	+	+	+
<i>Cladosporium</i> sp.	+	-	-	-
<i>Clonostachys</i> sp.	+	+	+	+
<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	-	-
<i>Cylindrocladium</i> sp.	+	-	-	+
<i>Fusarium</i> sp.	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp.	-	+	+	-
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+	+	+	-
<i>Phomopsis</i> sp.	-	+	-	-
<i>Thielaviopsis</i> sp.	+	+	+	-
<i>Trichoderma</i> sp.	-	+	+	+
<i>Ulocladium</i> sp.	-	+	-	-
<i>Verticillium</i> sp.	+	-	-	-

+ presente; - ausente; <sup>(1)</sup> Brotações coletadas no minijardim clonal; <sup>(2)</sup> tubetes coletados logo após a lavagem com jato de água quente; <sup>(3)</sup> Tubetes coletados na estufa em que continha miniestaca com podridão; <sup>(4)</sup> Britas coletadas do piso da estufa.

Segundo Ferreira (1989), o inóculo dos gêneros *Cylindrocladium*, *Fusarium*, e *Rhizoctonia* pode ser introduzido nas casas de vegetação junto com o substrato dos recipientes, ou na forma de conídios e/ou fragmentos de hifas em salpiques de solo aderidos às folhas ou às hastes das estacas trazidas do campo.

Por meio da técnica de diluição não se verificou fungos fitopatogênicos no substrato, na água utilizada na irrigação e na areia dos canaletões.

A ausência de *Cylindrocladium* no substrato novo mostra sua qualidade sanitária, reduzindo a possibilidade de servir como fonte de inóculo. No substrato

usado, este fungo foi constatado (FIGURA 7) não se recomendando o reuso, pelo risco de reinfestação dos tubetes, da casa de vegetação e infectar as miniestacas saudáveis. Solo artificialmente infestado com *Cylindrocladium* pode permanecer infestado por até sete meses (BROWN e FERREIRA, 2000).

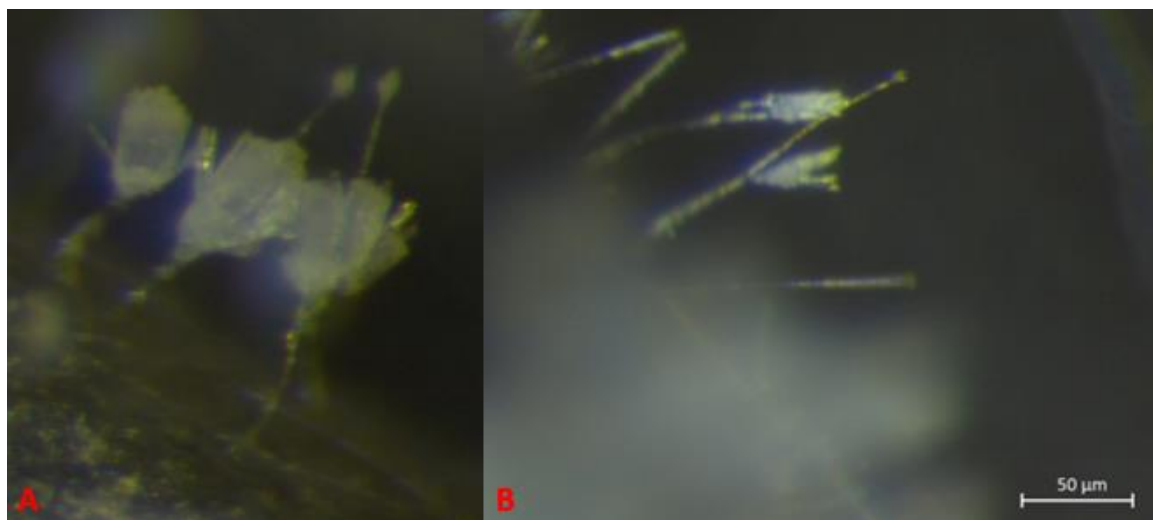


FIGURA 7 - CONIDIÓFOROS DE *Cylindrocladium* sp. OBSERVADOS EM TESTE COM ISCA EM SUBSTRATO USADO. A: ISCA COM FOLHA DE MAMONA. B: ISCA COM FOLHAS DE *Eucalyptus benthamii*. FONTE: O autor (2016).

Assim, brotações e miniestacas assintomáticas, tubetes, substratos usados e britas do piso da casa de vegetação podem ser fontes de inóculo dos patógenos encontrados neste estudo implicando que medidas sanitárias devem ser empregadas para impedir ou reduzir a podridão de miniestacas de acácia-negra.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ *Calonectria polizzii* e *Neopestalotiopsis clavispora* são os agentes causais da podridão de miniestacas de acácia-negra.
- ✓ *Colletotrichum* spp. e *Neopestalotiopsis clavispora* são fungos endofíticos associados à podridão de miniestacas de acácia-negra.
- ✓ Brotações assintomáticas, substrato usado e piso da estufa são fonte de inóculo de *Cylindrocladium* sp.
- ✓ Brotações e miniestacas assintomáticas e tubetes são fonte de inóculo de *Pestalotiopsis* sp.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido aos resultados encontrados nesse trabalho, algumas recomendações silviculturais podem ser feitas em relação ao controle de morte de miniestacas clonais de acácia-negra:

- ✓ Utilizar matrizes saudáveis e com alta capacidade de enraizamento;
- ✓ Lavar e desinfestar adequadamente os tubetes e bandejas;
- ✓ Não reutilizar o substrato;
- ✓ Manter as mudas em canteiros suspensos e bem espaçadas, para facilitar a aeração, entrada de luz e evitar a contaminação das mesmas pelos patógenos presentes no solo/piso;
- ✓ Substituir as britas por cimento ou trocar as britas com frequência para eliminar os inóculos de fungos fitopatogênicos.
- ✓ Estabelecer boas práticas de manejo no viveiro para eliminar os patógenos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5 ed. Academic Press, San Diego. 2005. 922p.

ALFENAS, A. C. Fungos do gênero *Cylindrocladium* como patógenos florestais, no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 11. p. 275-277. 1986.

ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R.C. Isolamento de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 53-91.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V. **Doenças na cultura do eucalipto**. SIF, Viçosa, 2007. 164 p.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2º Edição. Viçosa, MG. Editora UFV, 2009. 500 p.

ALTMAN, D.G. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman & Hall, 1991. 611 p.

APARECIDO, C.C.; FINATTI, D. Impacto do gênero *Cylindrocladium* para diferentes culturas. **Comunicado técnico – Instituto Biológico**, n.176. 2012. Disponível em:< [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=176](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=176) >. Acesso em: 14 jun. 2016.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKINSKY SOBRAL, J.; LACAVA, PT. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2008**: ano base 2007. Brasília: ABRAF, 2008. 90 p.

AUER, C.G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; MASCHIO, L.M. de A. **Doenças fúngicas em erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Colombo: Embrapa-CNPQ, 1995. 2 p. (Embrapa-CNPQ, Pesquisa em Andamento, 1).

AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos. **Principais doenças em viveiros de eucalipto**. In: DUTRA, L.F e WENDLING, I. Produção de mudas de eucalipto. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 184 p.

AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos ; FURTADO, E. L. Doenças do eucalipto. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Org.). **Manual de Fitopatologia**. 5ed. Ouro Fino: Editora Agrônômica Ceres Ltda., 2016, v. 2, p. 359-372.

AUER, C.G.; SOTTA, E.D. Patogenicidade de *Cylindrocladium candelabrum* em acácia-negra. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 30/31, p. 29-35. 1995.

BADALI, H.; CARVALHO, V.O.; VICENTE, V.; ATTILI-ANGELIS, D.; KWIATKOWSKI, I.B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE HOOG, G.S. *Cladophialophora saturnica* sp. nov. a new opportunistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v.47, p.55-66, 2009.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. New York: MacMillan, 1972. 241 p.

BROWN, B.N.; FERREIRA, F.A. Disease during propagation of eucalypts. In: Keane, P.J.; Kile, G.A.; Podger, F.D e Brown, B.N. (Eds.) **Disease and pathogens of eucalypts**. Canberra: CSIRO Publishing, p. 119-151, 2000.

BOLAND, D.J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N.; HYLAND, B. P. M.; JOHNSTON, R.D.; KLEINING, D. A.; TURNER, J. D. **Forest Trees of Australia**. Austrália, 1984. 687 p.

BONFIELD, J.; BEAL, K.; JORDAN, M.; CHEN, Y.; STADEN, R. **The Staden Package Manual**. Cambridge: Medical Research Council, 2002.

CABEL, S.R. **Relações entre condições meteorológicas com a ministaquia e a incidência de doenças bióticas em viveiro clonal de eucalipto no sul do Brasil**. Curitiba, 2014. 73 p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CALDEIRA, M. V. W.; RONDON NETO, R. M.; SCHUMACHER, M. V. Eficiência do uso de micronutrientes e sódio em três procedências de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, v. 28, n. 1, p.39-47, 2004.

CARPANEZZI, A. A. Espécies para recuperação ambiental. In: GALVÃO, A.P.M. (Ed.). **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo: Embrapa Florestas, p. 43-53, 1998.

CARVALHO, A.O.; ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L. Patogenicidade de fungos isolados de estacas de eucalipto para enraizamento, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n.2, p. 122. 1989 (Resumo 055).

CONTO, A.J. de; DOSSA, D.; DEDECEK, R.; CURCIO, G.R.; HIGA, A.R. Estrutura familiar e formação da renda entre pequenos acacicultores. In: 34º CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA, 1996, Aracaju. **Anais...** Aracaju: SOBER, 1997. p. 856-869.

DEDECEK, R.A.; HIGA, R.C.V. (Resp.). **Cultivo da Acácia-negra**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. Versão eletrônica. Disponível em <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AcaciaNegra/CultivodaAcaciaNegra/index.htm>> Acesso em 17 fev. 2016.

DISARZ, R.; CORDER, M.P.M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* De Wild. Sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, Viçosa, vol. 33, no.4, p. 599-606, 2009.

DORAN, J.C.; TURNBULL, J.W. **Australian trees and shrubs: species for land rehabilitation and farm planting in the tropics**. In: ACIAR Monograph, n. 24, Canberra, Austrália, 1997, 384p.

DUIN, I.M.; AUER, C.G.; HIGA, A.R. Levantamento preliminar de mortalidade de miniestacas e de mudas de *Acacia mearnsii* De Wild.. In: **5º Congresso Florestal Paranaense**, 2015, Curitiba. Anais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2015. v. 1. p. 001-001.

FARR, D.F.; ROSSMAN, A.Y. **Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory**, ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>>. Acesso em 18 jan. 2017.

FERRARO, L. W.; HASENACK, H. Clima. In: **Carvão e meio ambiente**. Porto Alegre, UFRGS. 2000. p. 22-44.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.

FERREIRA, F.A.; MENDES, J.E.P.; MAIA, J.L. Mortalidade de estacas enraizadas de *Pinus* spp. causada por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 201-201, 2005.

FERREIRA, F.A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do Eucalipto no Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 2012. 98 p.

FLEIG, F.D. **Análise econômica dos sistemas de produção com acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) no Rio Grande do Sul**. Santa Maria, 1993. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria.

FLÔRES JUNIOR, P.C. **Caracterização morfológica e análise de divergência genética entre clones de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.)**. Curitiba, 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal do Paraná.

FREDDO, A.R.; MAZARO, S.M.; BRUN, W.J.; JÚNIOR, A.W. Efeito da quitosana na emergência, desenvolvimento inicial e caracterização bioquímica de plântulas de *Acacia mearnsii*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 36, n. 6, 6 p., 2012.

FOWLER, J.A.P.; CURCIO, G.R.; RACHWAL, M.F.G.; DEDECEK, R.A.; SIMON, A.A. **Germinação e vigor de sementes de *Acacia mearnsii* De Wild. coletadas em diferentes povoamentos do Rio Grande do Sul**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2000. p. 1-4. (Comunicado Técnico, n. 39).



FURTADO, E.L.; SANTOS, C.A.G.; TAKAHASHI, S.S.; CAMARGO, F.R.A. **Doenças em viveiro de *Eucalyptus* sp.:** diagnóstico e manejo. Botucatu: Votorantim Celulose e Papel, Unidade Florestal, 2001. 23 p. (Boletim Técnico n.1).

GONÇALVES, J. de L. **Sazonalidade de ocorrência de mofo cinzento, oídio e manchas bacterianas foliares em dois viveiros de produção de mudas clonais de eucalipto.** 41 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014.

GONÇALVES, R.C.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia.** Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 92-102.

GRANT, J.E.; MORAN, G.F.; MONCUR, M.W. Pollination studies and breeding system in *Acacia mearnsii*. In: AUSTRALIAN TREE SPECIES RESEARCH IN CHINA. 1992, Zhangzhou. **Proceedings**, 48. Canberra: ACIAR, 1994. p. 165-170.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A., AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos. **Estratégia de Manejo de Doenças em Viveiros Florestais.** Colombo, PR. Embrapa Florestas. Ministério da Agricultura. Circular Técnica 47. 2001.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v.142, p. 2321-2331, 1996.

HILLIG, E.; HASELEIN, C.R.; SANTINI, E.J. Propriedades mecânicas de chapas aglomeradas estruturais fabricadas com madeiras de pinus, eucalipto e acácia-negra. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 59-70. 2002.

Indústria Brasileira de Árvores, IBÁ. **Relatório anual 2016** - ano base 2015. Brasília: IBÁ, 2016. 100 p.

KANNEGIESSER, U. Apuntes sobre algunas acacias australianas: 1. *Acacia mearnsii* De Willd. **Ciencia e Investigación Forestal**, v. 4, n. 2, p. 198-212, 1990.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology Evolution**, v.33, p.1870–1874, 2016.

LOMBARD, L.; RODAS, C.A.; CROUS, P.W.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. *Calonectria* (*Cylindrocladium*) species associated with dying *Pinus* cuttings. In: **Persoonia**, Leiden, v. 23, p. 41–47, 2009.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. Instituto Biológico, 2008. São Paulo. Publicações. **São Paulo: Secretaria de Agricultura e abastecimento**, 2008. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=77](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77) >. Acesso em: 14 jun. 2016.

MAESTRI, R.; GRAÇA, L.R.; SIMOES, J.W.; FREITAS, A.J.P. Análise da adubação fosfatada na produção física e econômica da acácia-negra. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n.17, p. 39-53, jun. 1987.

MAFIA, R.G.; AFENAS A.C. Preparações e observações microscópicas de espécimes fúngicos. In: ALFENAS A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 205-220.

MARCHIORI, J.N.C. **Dendrologia das angiospermas: leguminosas**. Santa Maria: Ed. UFSM, 1997. 200p.

MARTINEZ, D.T. **Seleção genética de *Acacia mearnsii* De Wild. (acácia-negra) visando o aumento da qualidade e produtividade de madeira e tanino no Rio Grande do Sul**. Curitiba, 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

MELLO, S.C.M. de; REIS, A.; SILVA, J.B.T. da. **Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: fungos filamentosos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 25 p.

MONCUR, M.W.; MORAN, G.F.; BOLAND, D.J.; TURNER, J. Floral morphology and breeding systems of *Acacia mearnsii* De Wild. In: USE OF AUSTRALIAN TREES IN CHINA, 1988, Guangzhou. **Proceedings...**, Canberra: ACIAR, 1989. p. 266-276.

MORA, A. L. **Aumento da produção de sementes geneticamente melhoradas de *Acacia mearnsii* De Wild. (Acácia negra) no Rio Grande do Sul**. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MORA, A.L.; SANTOS, A.F. dos; HIGA, A.R.; SIMOM, A.A. **Relatório de visita à África do Sul**. Curitiba: FUPEF, 2001. 12 p. Relatório técnico.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. **Firewood crops**. Shrubs and tree species for energy production. Vol. 1. Washington D.C. National Academy Press. 237 p. 1980.

NOVAES, A.B.; CARNEIRO, J.G.A., BARROSO, D.G.; LELES, P.S.S. Avaliação do potencial de regeneração de raízes de mudas de *Pinus taeda* L., produzidas em diferentes tipos de recipientes, e o seu desempenho no campo. **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.6, p.675-681, 2002.

OLD, K.M.; SEE, L.S.; SHARMA, J.K; YUAN, Z.Q. **A manual of diseases of tropical acacias in Australia, South-Est Asia and India**. CIFOR, Indonésia. 2000. 104 p.

OLIVEIRA, H.A. **Acácia-negra e tanino no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Tipografia Mercantil, 1960.

OLIVEIRA, H.A. **Acácia-negra e tanino no Rio Grande do Sul**. Canoas: La Salle, 1968.

PARADELA, A.L.; BEDENDO, I.P.; KRUGNER, T.L. Comunidade fúngica associada a brotações de *Eucalyptus* em jardim clonal e seu envolvimento na etiologia da podridão de estacas utilizadas para produção de mudas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.25, n.2, p.144-151, 1999.

PIRES, I.E.; RESENDE, M.D.V.; SILVA, R.L.; RESENDE JR., M.R.R. **Genética Florestal**. Viçosa: Editora Arka, 2011. 318 p.

ROUX, J., KEMP, G.H.J., WINGFIELD, M.J. Diseases of Black wattle in South Africa - a review. **South African Forestry Journal** 174: 35-40. 1995.

ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia mearnsii* De Wild. in South Africa. **Forest Ecology and Management**, South Africa, p.327-336, 1997.

SANTOS, A.F. dos. **Distribuição e estratégias de controle da murcha de *Ceratocystis* e da gomose de *Phytophthora* nas plantações brasileiras de acácia-negra**. Colombo: EMBRAPA – CNPF. 4 p. Nov. 2007. (Comunicado Técnico).

SANTOS, A.F. dos; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Caracterização de tipos de gomose da acácia-negra (*Acacia mearnsii*) no sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.37, p.31-40, 1998.

SANTOS, A.F. dos; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. 2001. 20 p. (Circular Técnica Nº 45 Embrapa).

SANTOS, A.F. dos; AUER, C.G.; WREGE, M.S.; LUZ, E.D.M.N. Impactos potencial das mudanças climáticas sobre a gomose da acácia-negra no Brasil. In GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. (Ed.). **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2011. p 119-141.

SANTOS, A.F. dos; FERREIRA, F.A. Uma ferrugem da acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 27:099-100. 2002.

SANTOS, A.F. dos; JÚNIOR, A.G.; AUER, C.G.; SANTANA, D.L de. **O complexo gomose da acácia-negra**. Colombo: Embrapa - CNPF, 2001a. 8p. (Circular Técnica 44).

SANTOS, A.F. DOS; LUZ, E. D. M. N. Gomose da acácia-negra causada por *Phytophthora nicotianae* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p-124, 2003.

SANTOS, A. F. DOS; LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T. *Phytophthora boehmeriae* causando a gomose da acácia-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 144, 2004.

SANTOS, F.E.M. dos; SOBROSA, R.D.C; COSTA, I.F.D; CORDER, M.P.M. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.11, n.1, p.13-20. 2001b.

SBRAVATTI JUNIOR, J. A.; AUER, C. G.; PIMENTEL, I. C.; SANTOS, A. F.; SCHULTZ, B. Seleção in vitro de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 43, n. 1, p. 145 - 152, jan./mar. 2013.

SCHNEIDER, P.R.; TONINI, H. Utilização de variáveis dummy em equações de volume para *Acacia mearnsii* de Wild. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 2, p. 121-129, 2003.

SCHULTZ, B. **Levantamento de Doenças bióticas e abióticas em *Eucalyptus benthamii* Maiden nos Estados do Paraná e Santa Catarina**. Curitiba, 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

SEARLE, S.D. *Acacia mearnsii* De Wild. (Black Wattle) in Australia. In: BROWN, A.G.; KO, H.C. (Ed.). **Black Wattle and its Utilisation**. Barton: RIRDC, 1997. p. 1-12.

SEIGER, D.S. Economic potential from Western Australian *Acacia* species: secondary plant products. **Conservation Science**, W. Aust. 4 (3): p. 109-116 (2002).

SHERRY, S.P. **The black wattle (*Acacia mearnsii*)**. Pietermaritzburg: University of Natal, 1971. 402 p.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. The Assistat Software Version 7.7 beta and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September 2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11522.

SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SILVEIRA, R.L.V. DA A., HIGASHI, E.M.; SGARBI, F.; MUNIZ, M.R.A. Seja o doutor do seu eucalipto. **Patafos Informações Agronômicas** Nº 93, 2001. 23p.

SIMON, A.A. A cadeia produtiva da acácia-negra, aspectos econômicos, sociais e ambientais. In: STROHSCHOEN, A.G.; REMPEL, C. **Reflorestamento e recuperação ambiental**: Ambiente e tecnologia: o desenvolvimento sustentável em foco. Lajeado: Univates, 2005. p. 149-166.

SOTTA, E.D.; AUER, C.G. **Levantamento de fungos associados a gomose em acácia-negra**. Colombo, PR: Embrapa-CNPQ, 1995. 2p. (Embrapa-CNPQ. Pesquisa em andamento, 2).

SOTTA, E.D.; HIGA, A.R.; LAVORANTI, O.J.; STEIN, P.P. **Avaliação dos danos causados pela gomose em acácia-negra**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 15p. Relatório técnico.

STEIN, P.P.; TONETTO, L. Black Wattle Silviculture in Brazil. In: BROWN, A.G.; KO, H.C. (Ed.). **Black wattle and its utilisation**. Barton: RIRDC, 1997. p. 78-82.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. Kew: CMI, 1980. 696 p.

SUTTON, J.C.; LIU, W.; MA, J.; BROWN, W.G.; STEWART, J.F.; WALKER, G.D. Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. **Acta Horticulturae** 782: 279-286. 2008.

VITTI, A.N.; KRÜGNER, T.L.; VIEIRA, J.D. Etiologia da podridão de estacas de *Eucalyptus* spp. em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n.2, p. 126, 1989 (Resumo 083).

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: INNIS, M.A. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. London: Academic Press, 1990.